



Mezőgazdasági melléktermékek enzimes hidrolízise és a folyamat kinetikai modellje

OTDK-dolgozat

Gubicza Krisztina

biomérnöki BSc

III. évfolyam

Témavezető

Dr. Barta Zsolt

egyetemi tanársegéd

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2012

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009
"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben"
című program támogatta.

Tartalom

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 A bioetanol	5
2.2 A lignocellulózok szerkezete.....	6
2.3 A lignocellulóz biomassa előkezelése és enzimes hidrolízise	7
2.4 Az enzimes hidrolízis kinetikai modellezése	9
2.5 Az irodalmi modellek bemutatása	10
3. Anyagok és módszerek.....	17
3.1 Felhasznált anyagok és reagensek	17
3.1.1 A hidrolízishez használt szubsztrát és enzimek	17
3.1.2 A mérésekhez használt oldatok és reagensek.....	17
3.2 Az enzimes hidrolízis során alkalmazott módszerek	18
3.2.1 A kísérletek tervezése	18
3.2.2 A kísérletek kivitelezése	18
3.2.3 DNS-reagens kalibrálása, redukálócukor-tartalom mérése	19
3.2.4 HPLC-analízis	20
3.3 A modellalkotás során használt eszközök.....	21
4. Eredmények és értékelésük	23
4.1 A búzaszalmával végzett kísérletek eredményei.....	23
4.2 Az irodalmi modellek vizsgálatának eredményei	26
4.2.1 A búzaszalmával végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés.....	26
4.2.1.1 A mosott rosttal végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés	26
4.2.1.2 A teljes előkezelt anyaggal végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés	30
4.2.2 A kukoricaszárral végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés.....	31
4.3 A saját modell és vizsgálatának eredményei.....	33
5. Összefoglalás	36
6. Irodalomjegyzék.....	37

1. Bevezetés

A 2000-es évek elején a folyékony üzemanyagok 97%-át még kőolajból állították elő. Annak érdekében, hogy az áremelkedések és a változó politikai helyzet miatt csökkentsék a fosszilis üzemanyagoktól való függőséget, a kormányok nagyszabású kutatások elindítását kezdeményezték az alternatív folyékony üzemanyagok megújuló forrásokból, nagy mennyiségben történő előállítására. Az Európai Unió célul tűzte ki, hogy 2030-ig a közlekedésben felhasznált üzemanyagok 25%-a bioüzemanyag legyen. Ilyen mennyiségek esetében a cukorrépából, cukornádból vagy kukoricából előállított, első generációs bioetanol nem elegendő, ráadásul élelmiszer-alapanyagok felhasználása üzemanyag előállítása céljából erősen vitatott. Ennek eredményeként a lignocellulóz biomassza felé terelődött a figyelem, mivel megközelítőleg 70% poliszacharidból áll. Egyaránt felhasználhatóak a fás- és lágyszárúak. Utóbbira példák a nagy mennyiségben rendelkezésre álló mezőgazdasági melléktermékek, úgy, mint a kukoricaszár vagy a búzaszalma.

Napjainkra a bioetanol-gyártás enzimes útja került a kutatások középpontjába a biomassza monomer cukrokká alakítását tekintve. A cellulóz glükózzá történő enzimes hidrolízise a bioetanol előállításának egyik legfontosabb lépése. A cellulázok által katalizált lépés heterogén folyamat, melyre jellemző, hogy számos tényező befolyásolja, továbbá magas konverziófoknál nagymértékű reakciósebesség-csökkenés figyelhető meg. Annak érdekében, hogy a hidrolízis minél hatékonyabban valósuljon meg, szükséges sebességének és hozamának növelése, a folyamat körülményeinek optimalizálása, valamint fejlesztést igényel az enzimek tekintetében is. Ezeken a területeken az előrelépés erősen függ az enzim-szubsztrát kölcsönhatások és a reakciósebesség-csökkenés okainak kvantitatív leírásától, azok pontosságától. Az enzimes hidrolízis kinetikai modellezése segítséget nyújt mindehhez, hiszen egy megfelelő modell jól használható a reakciókörülmények optimalizálásánál, kísérlettervezésnél, és amellet, hogy hasznos előrejelző eszköz is, segítségével csökkenthető a kísérletek száma. Olyan fontos tényezők szerepelnek benne, melyek befolyásolják a reakciót, így segít az enzimes hidrolízis kinetikájának leírásában és megértésében.

Az elmúlt években jelentősen megnövekedett az enzimes hidrolízis kinetikájával foglalkozó publikációk száma. Ugyan a cellulázok lignocellulóz biomasszán való működésének pontos mechanizmusa még nem ismert, az irodalomban fellelhető modellek több, az enzimaktivitást és a reakciósebességet befolyásoló tényező hatását megmagyarázták. A modellek megalkotásához és validálásához különböző feltételezéseket alkalmaztak a sebességcsökkentő tényezők és az alapvető enzim-szubsztrát kölcsönhatások tekintetében, ugyanakkor további vizsgálatok, kísérleti adatok szükségesek ezen feltevések bizonyításához.

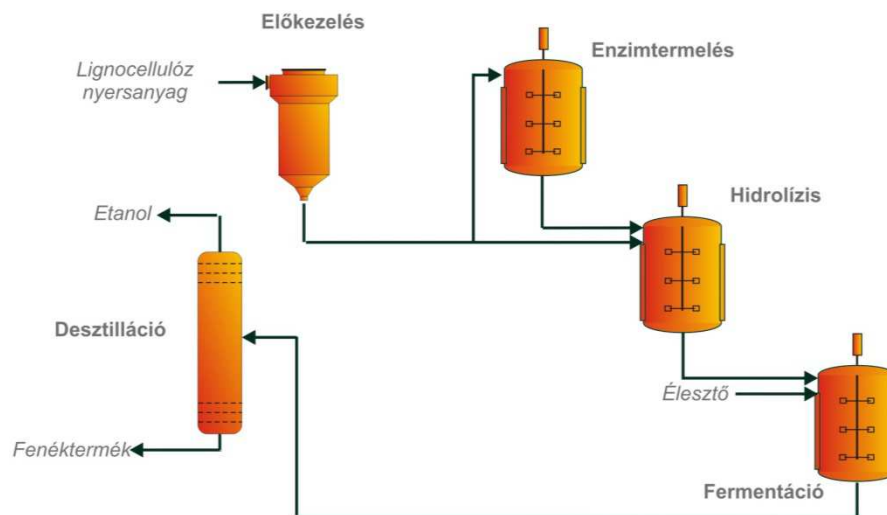
2. Irodalmi áttekintés

2.1 A bioetanol

A bioetanol olyan alkohol, melyet magas cukor-, keményítő- vagy lignocellulóz-tartalmú növényekből állítanak elő. Először Nicholas Otto (az Otto-motor feltalálója) kezdeményezte az etanol motorhajtóanyagként való használatát 1860 körül. Az érdeklődés a bioetanol iránt először az 1970-es években, az olajárrobbanás után növekedett meg elsősorban az Amerikai Egyesült Államokban, és nagyszabású kutatások indultak annak érdekében, hogy elősegítsék a fenntartható, megújuló forrásokból származó alternatív üzemanyagok fejlődését. Ezen programok támogatása mellett adókedvezményekkel is ösztönözték az ipart arra, hogy nagy mennyiségben állítson elő bioetanolt, aminek következtében az éves termelés az 1983-as 757 millió literről 20 év alatt 10,9 milliárd literre növekedett. Ez a mennyiség 2010-re elérte az 51 milliárd litert, és ez a tendencia azóta is folytatódik [1]. Nemcsak az USA-ban nőtt meg az igény az alternatív hajtóanyagok iránt: az Európai Unió célul tűzte ki, hogy 2030-ig a közlekedésben felhasznált üzemanyagok 25%-a biomasszából származó legyen [2].

A kutatókat az élelmiszerárak ezzel együtt történő emelkedése, valamint az egyre nagyobb igény ösztönözte arra, hogy a kukorica, a cukorrépa vagy a cukornád helyett más, társadalmilag is sokkal elfogadhatóbb forrást keressenek a bioetanol-gyártáshoz. A lignocellulóz biomassza alkalmasnak bizonyult erre a célra, hiszen például a mezőgazdasági melléktermékek (kukoricaszár, búzaszalma, stb.) nagy mennyiségben állnak rendelkezésre. A környezetvédelmi és fenntarthatósági szempontok mellett szerepet játszik az is, hogy az alapanyagforrások földrajzilag sokkal jobban el vannak osztva, mint a fosszilis energiahordozók. A kutatásokon alapuló fejlesztések célja a gazdaságos megvalósíthatóság, olyan technológia kidolgozása, mely az olcsó és hatékony enzimekre, alapanyagokra és az eredményes folyamattervezésre összpontosít.

A második generációs lignocellulóz alapú bioetanol-gyártás négy fő lépésből áll: előkezelés, hidrolízis, fermentáció, elválasztás (1. ábra). A műveletsor tartalmazhatja az enzimtermelést is, amennyiben nem kereskedelmi enzimkészítményeket használnak a folyamatban. Van azonban olyan összefoglaló publikáció [3], amely ide sorolja a megfelelő biomassza kiválasztását is, jelezve ezzel, hogy kiemelten fontos az, hogy milyen szubsztráttal dolgozunk.

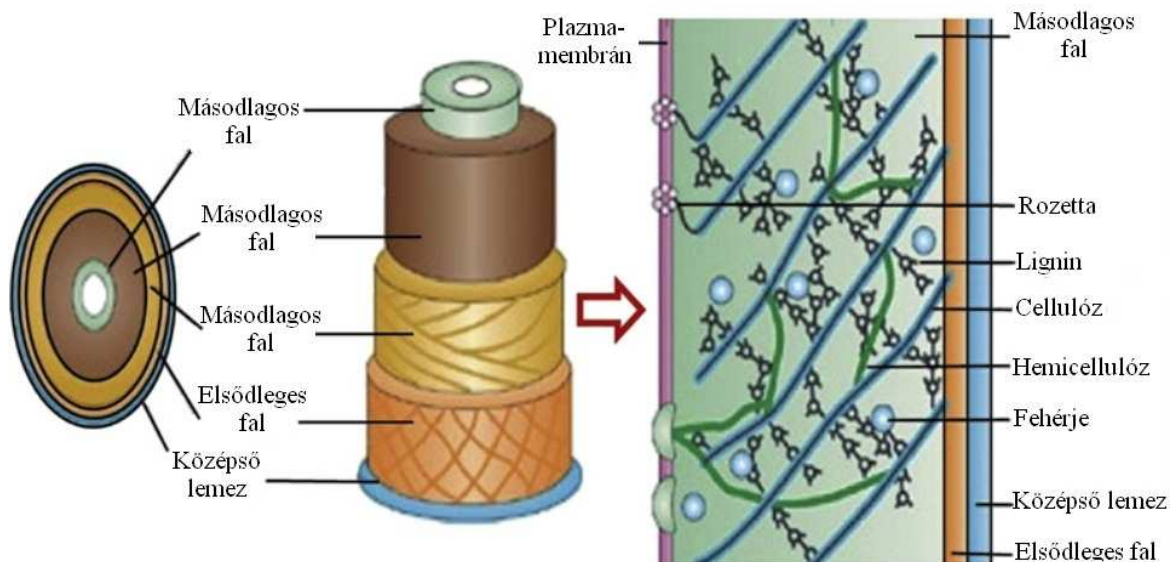


1. ábra

A második generációs lignocellulóz alapú bioetanol-gyártás lépései

2.2 A lignocellulózok szerkezete

A lignocellulóz biomasszának három fő összetevője van: cellulóz, hemicellulóz és lignin (2. ábra). A gazdaságos megvalósítást nagy mértékben segítené, ha mind a három komponenst fel lehetne használni. Közülük a cellulóz és a hemicellulóz szolgálhat kiindulási alapanyagként bioetanol előállításához, ezek a teljes biomassza körülbelül 70%-át teszik ki [4], és a ligninhez kovalens illetve hidrogénkötésekkel kapcsolódnak. Ez a szerkezetet meglehetősen stabillá és ellenállóvá teszi a lignocellulózokat a kezelésekkel szemben.



2. ábra

A lignocellulózok szerkezete [3]

A cellulóz a növényi sejtfal fő alkotója, melyben a glükózmolekulák egymáshoz $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidos kötésekkel kapcsolódnak, és több ezer egységnyi hosszú láncot alkotnak. Az szomszédos láncok hidrogénhidakkal kötődnek egymáshoz, ezáltal erős, kristályos szerkezetet létrehozva: ezek alkotják az elemi rostokat. Mivel az iparban elsősorban alkalmazott élesztő, a *Saccharomyces cerevisiae* csak a hat szénatomos cukrokat (például glükózt) képes etanollá fermentálni, ezért a második generációs bioetanol-előállítás legfontosabb lépése a cellulóz hidrolízise egyszerű cukrokká. Az öt szénatomos cukrokat nagy arányban tartalmazó hemicellulózból történő gyártáshoz az öt (D-xilóz, L-arabinóz) és a hat (D-glükóz, D-galaktóz, D-mannóz) szénatomos cukrok együttes fermentációjára van szükség, de erre ez az élesztőgomba egyedül vagy genetikai módosítások nélkül nem képes.

2.3 A lignocellulóz biomassa előkezelése és enzimes hidrolízise

A növényi szénhidrátok enzimes hidrolízise két módszerrel történhet: a folyamatot katalizálhatja sav (például kénsav) vagy enzim, de az előbbiekkal szemben számos előnye létezik az enzimes technológiáknak. Ennek következtében az utóbbi időben a bioetanol-gyártás enzimes útja került a kutatások középpontjába a biomassa monomer cukrokká alakítását tekintve, melyeket aztán bioetanollá fermentálnak. A biomassa szerkezetéből következően azonban a cellulóz természetes formájában nem alkalmas biokonverzióra, a hidrolízis előtt hozzáférhetővé kell tenni azt az enzimek számára. A lignin ugyanis erősen kötődik hozzá a növényi sejtfalban, ezáltal nemcsak a víz, de az enzimek sem tudnak behatolni a cellulózzrostok közé. A lignin irreverzibilisen gátolja az enzimműködést, így a folyamat sikeres kimenetele erősen függ az előkezelés, azaz a lignin eltávolításának vagy módosításának hatékonyságától.

Az előkezelés feltétele a minimális energiabevitel és költséghatékonyság mellett, hogy ne járjon anyagvesztéssel, és korlátozott legyen az inhibitorok képződése. Az előkezelés lehet fizikai (extrúzió, őrlés, γ -, elektron- vagy mikrohullámú sugárzás), termokémiai (gőzrobbantás), kémiai (savas, lúgos, szerves savas, ionos folyadékokkal történő előkezelés) vagy biológiai (rothasztó gombákat alkalmazó), illetve ezek kombinációja [3].

A cellulózláncok glükózegységekké történő lebontását a celluláz enzimrendszer végzi:

- *endoglukanázok*, melyek véletlenszerűen hasítják a $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidos kötéseket a cellulózlánc belsejében;
- *cellobiohidrolázok*, melyek cellobiózt szabadítanak fel a lánc végéről;
- *β -glükozidázok*, melyek a cellobiózt glükózzá alakítják, és a celooligoszacharidokról glükózegységeket hasítanak le.

Ezek együttesen végzik a cellulóz hidrolízisét, egyúttal hozzáférhetővé teszik a következő enzim számára a szubsztrátot. A folyamat heterogén reakciók sorozataként írható le, azaz a cellulázok vizes közegben reagálnak az oldhatatlan, szerkezetét tekintve igen stabil szubsztráttal. A fenti enzimrendszerek termelése több aerob baktériumnál és gombánál megfigyelhető. Ezek közül a *Trichoderma reesei* és az *Aspergillus niger* a két legtöbbet tanulmányozott [2].

A lignocellulózok enzimes hidrolízisét befolyásoló tényezőket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

A lignocellulózok enzimes hidrolízisét befolyásoló tényezők csoportosítása

Reakciókörülmények	Szubsztráthoz kapcsolódó tényezők	Enzimhez kapcsolódó tényezők
hőmérséklet pH fordulatszám	szubsztrátkoncentráció lignin jelenléte felület nagysága kristályosság pórusméret polimerizáció foka hemicellulóz-tartalom	enzimadszorpció termékinhibíció

A cellulóz glükózzá történő enzimes hidrolízisének eredményességét az jellemzi, hogy megvalósult-e a monomer cukrokká alakulás, illetve a szubsztrát szénhidráttartalmának hány százaléka szabadult fel oldható cukrokként. A legtöbb esetben a cellulózból keletkezett glükóz hozamával adják meg az enzimes hidrolízis hatékonyságát.

2.4 Az enzimes hidrolízis kinetikai modellezése

A második generációs, azaz a lignocellulóz alapú bioetanol-gyártás jelentős hátránya az első generációs technológiával szemben, hogy költségei sokkal nagyobbak. Az enzimes hidrolízis gazdasági szempontból is egyik kulcslépése az előállításnak [5], így kiemelt fontosságú ezen folyamat körülményeinek optimalizálása, a reakciósebesség és a hozam növelése, nem utolsósorban pedig az enzimeket érintő fejlesztések. Mindehhez elengedhetetlen az enzim-szubsztrát kölcsönhatások és a sebességcsökkenés okainak, a folyamatot befolyásoló tényezők hatásának pontos, kvantitatív leírása. Az enzimkinetikával foglalkozó kutatások egy része arra irányul, hogy a cellulázok működésének mechanizmusát feltárja, leírja, a másik felük pedig modellek kifejlesztését tűzi ki célul. A kinetikai modell a folyamat állapotának időbeli változását követi, és matematikai összefüggéseken keresztül ad választ arra, hogy bizonyos paraméterektől hogyan függ annak sebessége. A cellulóz hidrolízisének időbeli alakulása jellemezhető a folyamat során felszabaduló cukrok, leggyakrabban a glükóz mennyiségével.

Egy megfelelő modell jól használható a reakciókörülmények optimalizálásánál, kísérlettervezésnél, hiszen segítségével csökkenthető a kísérletek száma, emellett hasznos előrejelző eszköz is az eredményeket illetően. Olyan fontos tényezők szerepelnek benne, melyek befolyásolják a reakciót, így segít az enzimes hidrolízis kinetikájának leírásában és megértésében. Az irodalomban fellelhető modellek több, az enzimaktivitást és a reakciósebességet befolyásoló tényező hatását megmagyarázták, de a cellulázok lignocellulóz-tartalmú biomasszában való működésének pontos mechanizmusa még nem ismert, vagy a korábban felírt összefüggések csak bizonyos korlátok mellett állják meg a helyüket. Ezért további vizsgálatok, kísérleti adatok szükségesek a meglévő modellek fejlesztéséhez. A modell megfelelőségét továbbá igazolni kell azáltal, hogy a megalkotásához felhasznált eredmények kísérleteitől eltérő körülmények között is jól írja le a folyamatot (például különböző szubsztrátkoncentrációk, enzim dózisok vagy akár szubsztrátok esetén). Az összefüggések validálása tehát elengedhetetlen ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a létrehozott modell szélesebb körben is alkalmazható.

Az enzimes hidrolízis kinetikai modellezésének fontosságát mutatja, hogy az elmúlt években egyre több publikáció foglalkozott a folyamatot leíró matematikai összefüggések vizsgálatával, fejlesztésével [6-28].

2.5 Az irodalmi modellek bemutatása

A lignocellulózok enzimes hidrolízisének kinetikája a folyamat heterogén (szilárd-folyékony) természetéből adódóan eltér a hagyományos, Michaelis-Menten-féle enzimkinetikától, és ugyanezen okból kifolyólag sokkal összetettebb is. Egy 2009-ben közzétett összefoglaló publikáció [6] feldolgozza az addig felállított modelleket. Az enzimes hidrolízis hat fő lépését különíti el, ezt a számot a heterogén folyamattal indokolja:

1. Cellulázok adszorpciója a szubsztrátra a kötő alegység által
2. Cellobiohidroláz elhelyezkedik a lánc végén, illetve az endoglükánáz a hasítható kötésnél
3. Enzim-szubsztrát komplex kialakulása (cellobiohidroláz esetében a láncvég a katalitikus alegységbe kerül)
4. β -glikozidos kötések hidrolízise, ezzel egyidejűleg az enzim továbbhalad a cellulózlánc mentén
5. Celluláz enzimek deszorpciója a szubsztrátról, vagy a 4. illetve a 2. vagy 3. lépések megismétlése, ha csak a katalitikus egység el nem válik a lánctól
6. β -glükózidáz (ha jelen van az enzimkeverékben) hidrolizálja a cellobiózt glükózzá

Ezen felül a termékinhibíció és a szubsztrát tulajdonságainak változásai is befolyásolják a fenti lépéseket a hidrolízis alatt.

A fent említett publikáció a modelleket az alapján, hogy milyen megközelítést és módszert alkalmaznak, négy csoportba sorolja:

1. Kísérleti (empirikus) modellek
2. Michaelis-Menten kinetikán alapuló modellek
3. Adszorpciós modellek
4. Oldható szubsztrátokhoz kifejlesztett modellek

Az említett összefoglaló közlemény az addigi modellek felvonultatása és csoportosítása mellett néhány példára tér ki részletesebben. A továbbiakban ezen túlmutatóan mutatok be modellezési kísérleteket, azok eredményeit, különös tekintettel az idézett publikáció után megjelentekre.

Jó példa a kinetikai modellek alkalmazására, hogy az enzimkinetika és a fizika-kémiai paraméterek közötti összefüggéseket mutatja be egy 1997-es publikáció [7]. Megállapították, hogy az enzimhez hozzáférhető felület nagysága irányítja lebontást, ezzel pedig a további kutatásokhoz adnak alapvető kiindulópontot.

Biológiai és biokémiai tulajdonságok egyaránt szerepelnek abban a modellben [8], amelynél a kísérletekhez mikrobaként a *Trichoderma reesei*-t használták. A mikrobát jellemző két összefüggés mellett a celluláz szubsztráton való megkötődését, valamint a konverzió növekedésével történő reaktivitáscsökkenést vették figyelembe. Ez a modell azonban csak akkor használható, ha vannak enzimeket termelő mikrobák is a rendszerben.

Az első- és másodrendű enzimaktiválódáson alapul egy 2010. évi modell [9]. Egy korábbi, optimalizálásra megalkotott összefüggést [10] módosítottak, a kísérleti adatokat gőzrobbantással előkezelt búzaszalmával végzett hidrolízis eredményei szolgáltatták. Két háromparaméteres összefüggést adnak meg, melyek egyszerűen alkalmazhatók, később mások is felhasználták, ellenőrizték alkalmazhatóságukat [11]. A következő fejezetben részletesen bemutatom őket, és kitérek a vizsgálatukra is. Zhuoliang és munkatársai [12], akik modellszubsztrátokkal dolgoztak, szintén az adszorbeált celluláz inaktiválódását vették alapul, ők azonban csak elsőrendűként tekintettek a folyamatra. A reakciósebességre adtak meg összefüggést, és a kísérleti adatok felhasználásával jó eredményeket kaptak, de az előző modell a gyakorlat számára alkalmazhatóbbnak tűnik.

Nem csak a szubsztrát szempontjából számít egyedülállónak a *Leymus triticoides* [13] enzimes hidrolízisével foglalkozó publikáció. A folyamat leírására olyan modellt fejlesztettek ki, amelyik egy homogén reakciót (cellobióz $\rightarrow$ glükóz) és két heterogén reakciót foglal magában (cellulóz $\rightarrow$ cellobióz és cellulóz $\rightarrow$ glükóz). Ez az első olyan modell, amely beépítette a lignin reakciósebesség-csökkentő hatását az enzim cellulázra történő adszorpciójának Lagmuir-izoterma szerinti leírásával, és ezzel jelentősen javult az előrejelző-képessége. Figyelembe vette továbbá a hidrolízis során keletkező termékek (glükóz és cellobióz) által fellépő kompetitív inhibíciót.

Kadam és munkatársai [14] általános differenciálegyenleteken alapuló, validált modellje a következő feltételezésekből indul ki:

- a cellulóz-, cellobióz- és glükózkoncentrációk időben változnak,
- a sebességi egyenletek feltételezik az enzimadszorpciót a Langmiur-izoterma szerint,
- a cellulóz hidrolízisének termékei, a glükóz a cellobióz, valamint a xilóz kompetitíven gátolják az enzimes hidrolízist,
- minden reakció feltételezi az Arrhenius-összefüggés szerinti hőmérsékletfüggést, ugyanakkor a valóságban ennek különbözőnek kell lennie az egyes enzimekre nézve, hiszen más a hőstabilitásuk mértéke, és a β -glükozidáz a legstabilabb, így ez a feltételezés egyszerűsítés,
- a cellobióz glükózzá alakulása a Michaelis-Menten-féle modellt követi.

Két heterogén (cellulóz cellobiózzá és glükózzá alakulása) és egy homogén (cellobióz glükózzá alakulása) reakciót modelleztek. A paramétereket kukoricaszáron végzett kísérletek eredményei alapján határozták meg. A korábbi modellekhez képest új ezekben az összefüggésekben, hogy figyelembe veszik a xilózinhibíciót, valamint a β -glükozidáz-tartalom hatását. Hodge és munkatársainak publikációja [15] jó példa a kinetikai modellezés alkalmazására, hiszen a kísérleti munka mellett ezt a modellt is felhasználták az enzimes hidrolízis folyamatának optimalizálására, és segítségével könnyebben tudták azonosítani a gátló tényezőket.

Az eddigiektől jelentősen eltérő megközelítést (populációmérleg) alkalmaztak Seyed és munkatársai [16, 17]. Elsőként vizsgálták a cellulózlánc hosszának alakulása szempontjából az enzimes hidrolízist. A modellalkotáskor abból indultak ki, hogy a kötés felbomlása és az enzimes reakcióra való fogékonyság a cellulózláncban elfoglalt hely függvénye. Az első publikációjuk az endoglükánázra, a második az exoglükánázra ír fel összefüggést. A modellalkotás megközelítésének szempontjából újnak és egyedinek számít közleményük.

Väljamäe és munkatársai [18] a hidrolízis kezdeti szakaszának kinetikáját vizsgálták, és a sebességcsökkenés hátterének feltárásán dolgoztak. Az általuk megadott exponenciális összefüggésben szereplő paramétereknek nincs fizikai jelentése, céljuk vele az adatok könnyebb kezelhetősége volt, és további megállapításaikat ezekkel támasztották alá. A sebességcsökkenés korábban feltételezett okai közül a cellobióz által kiváltott

termékinhibíciót vagy az enzim inaktiválódását kizárták a jelenség elsődleges előidézői közül, a nem produktív enzim-szubsztrát kötések által okozott sztérikus gátlást és a cellulóz felszínének erózióját építették be szimulációjukba.

Carillo és munkatársainak [19] közleménye búzaszalma lúgos előkezelésének a reakciókinetikára gyakorolt hatását vizsgálja. A módosított Henri-Michaelis-Menten egyenletet alkalmazták az enzimkoncentráció befolyásának tanulmányozására, ebből számolták ki a kezdeti reakciósebességet. A kezdeti sebességből kiinduló összefüggések hátránya azonban, hogy a rendszer fontos kinetikai és szerkezeti jellemzőit nem veszik figyelembe, például nem lehet tudni, hogy az diffúzólimitált-e vagy sem. Megvizsgáltak egy másik modellt is, aminek két paramétere leírta ezt a tulajdonságot is, és így módon sokkal összetettebb következtetések levonására alkalmas.

Gan és munkatársai [20] publikációjának legnagyobb értékét az általuk bevezetett új paraméterek adják. Ilyen a cellulóz-hozzáférhetőségi koefficiens (σ), a felületaktív cellulózkoncentrációs koefficiens (β), valamint a relatív nyíróerőnek kitett közegben eltöltött idő ($\Gamma/\Gamma_{\max}$) (minden, az enzim inaktiválódását befolyásoló, nem termékinhibíciós tényező ehhez a paraméterhez köthető). A korábbi modellekhez képest részletesebb leírást ad az enzimes hidrolízis kinetikájának változó dinamikájáról, ugyanakkor a szerzők elismerik, hogy nem veszik figyelembe a cellulázok közti szinergiát.

Percival Zhang és munkatársainak [21] összefoglaló publikációja az enzimes hidrolízis kinetikai modelljeire is kiterjed. Munkájukban bemutatnak egy lehetséges csoportosítást a modelleket illetően, és kitérnek ezek gyakorlati alkalmazhatóságára is:

1. *Nem mechanisztikus modellek*: olyan kísérleti adatokon alapulnak, amelyek nem számolnak az adszorbeált cellulózkoncentrációval. Használhatók adatok összehasonlítására, de többségük nem működik azon körülményeken kívül, melyek között megalkották őket.
2. *Félmechanisztikus modellek*: beépítették az adszorpciót, de a szubsztrát állapotát csak a koncentráció, mint változó írja le (félmechanisztikus a szubsztrát szempontjából), és/vagy egyszerű cellulózhidrolizáló aktivitáson alapulnak (félmechanisztikus az enzim szempontjából). Így módon jól alkalmazhatók akkor, amikor elég minimális információ a rendszerről, viszont több tényező hatását nem tudják leírni.

3. *Funkcionális alapú modellek:* beépítették az adszorpciót, a koncentráción kívül más szubsztrátot jellemző változót és a többszörös enzimaktivitást is. Alkalmask tehát több tényező hatásának leírására, akár bioreaktorok tervezésére, viszont nem nyújtanak további jelentősebb információt a rendszerről.
4. *Szerkezeti alapú modellek:* a cellulázok komponenseinek szerkezetén, illetve az enzimek szubsztrátokkal való kölcsönhatásain alapulnak. Jóval szélesebb körben alkalmazhatók, mint az előbbiek, továbbá megfelelőek a celluláz szerkezete és működése közti összefüggések leírására.

Ugyanezen szerzők [22] celluláz enzimek kinetikáját leíró modellje az első, amelyet egyféle paraméterkészlettel is eredményesen alkalmaztak különböző szubsztrátokra. Első abban a tekintetben is, hogy több, az enzimes hidrolízishez kapcsolódó viselkedést leír. Ezeknek köszönhetően szélesebb körben alkalmazható, mint a korábbi összefüggések. A modell differenciálegyenletekből áll, és sebességi illetve disszociációs állandókon alapul. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy két olyan fontos változó beépítése a modellbe, amely a szubsztrátot érinti, számos jelenség leírásához elegendő. Esetükben az egyik ilyen paraméter a polimerizáció foka (DP), a másik a cellulázok számára elérhető felület (F_a).

Mivel a kommunális hulladéknak magas a szénhidráttartalma, alkalmasnak találták ezt is bioetanol előállítására [23]. Ezen alternatív szubsztrát alkalmazása előnyt jelenthet a kiindulási anyagok költségeinek szempontjából. A publikációban szereplő egyszerű, exponenciális összefüggés segítségével minden előkezelési módhoz meghatároztak egy időállandót, mely azt a hidrolízis során eltelt időt jelenti, melynél a keletkezett glükóz szintje eléri azon glükózkoncentráció 63,2%-át, amikor a reakciósebesség még éppen nem kezd el csökkenni hidrolízis során.

A konverziófok időbeli alakulását írja le az a modell [24], mely alapvetően a keresztszinergia (azaz ugyanazon mikroorganizmusból származó enzimek együttes alkalmazása hatékonyabb, mint külön-külön) jelenségére gyakorolt hatásokat vizsgálta. A két paraméter a maximális konverziófok, illetve az ennek eléréséhez szükséges idő, mind a kettőt jelentősen befolyásolta a megfigyelt két hatás, a delignifikáció és a kristályosság mértéke.

Egy, az együttes hidrolízist és fermentációt (SSF – Simultaneous Saccharification and Fermentation) vizsgáló tanulmányban [25] megállapították, hogy az enzimes hidrolízis reakciósebességének csökkenésében kevés szerepe van a szubsztrátreaktivitásnak, ennek leírásához elégnék bizonyult az enzim inaktiválódásának és a termék-inhibíciónak a figyelembe vétele. A modellben bevezettek továbbá egy szubsztrátfüggő, előzetesen becsült paramétert, melynek értékét a vizsgált, leggyorsabban elhidrolizáló szubsztrát esetében 1-nek vették, a többit pedig ehhez viszonyították.

Többféle szubsztrát és az ultrahangos sugárzás hatásának vizsgálatáról számol be a modellalkotás során Li és munkatársai [26] közleménye. Ennek megfelelően arra vonatkozóan közöl megállapításokat, hogy különböző szubsztrátok esetén mely modellparaméterek térnek el; ilyen az enzim szubsztráthoz való kötődésének sebességi állandója, vagy az oligoszacharidok monoszacharidokká való bomlásának egyensúlyi állandója. Megállapították ugyanakkor, hogy a szubsztrát fajtája nem befolyásolja a Michaelis-állandót (azaz az enzim affinitását a cellulózhoz), sem a kompetitív inhibíció K_i konstansát. Az általuk alkotott modellt vizsgálta meg egy másik szempontból az a tanulmány, mely a pálmaolaj-előállítás melléktermékeit alkalmazta szubsztrátként [27]. Megállapították, hogy a sebességi állandóra hat a szubsztrát részecskemérete, de a Michaelis-konstantra nem. A szerzők további modelleket vizsgálva azt tapasztalták, hogy azok az összefüggések jobban teljesítenek, melyek paraméterként beépítik a termék-inhibíciót is.

Egy 2012. évi modell [28] gőzrobbantással előkezelt, mosott búzaszalmán végzett kísérletek eredményein alapul. Figyelemmel van a folyamat heterogén voltára, és magában foglal egy preexponenciális tényezőt, ami függ az enzimkoncentrációtól, csökken a hidrolízis előrehaladtával, és kifejezi a reakciósebesség csökkenését. A kísérleteket állandó enzimkoncentráció mellett, különböző hőmérsékleteken végezték. A rendszer aktiválási energiája változatlan a folyamat során. A megalkotott új összefüggés a hidrolízis fokát fejezi ki az idő, az enzimkoncentráció és a hőmérséklet függvényében.

A fentiekből látszik, hogy milyen sokféle szubsztrátot használtak a kísérletekhez, milyen eltérő megközelítéseket és paramétereket alkalmaztak a felsorolt publikációkban, azonban a sokszor nem megfelelő pontosság és a korlátok miatt a terület további kutatására van szükség.

Munkám célja az irodalomban fellelhető, lignocellulózok enzimes hidrolízisét leíró modelleknél jobb egyezést mutató összefüggés kidolgozása.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok és reagensek

3.1.1 A hidrolízishez használt szubsztrát és enzimek

Az enzimes hidrolízis kísérleteit búzaszalma szubsztráton végeztem el. Ennek az előkezelése a spanyolországi CIEMAT kutatóintézetben történt. Az extrúzió hőmérséklete 68°C volt, katalizátorként 7,5 g NaOH-ot alkalmaztak 100 g szárazanyaghoz. Dolgoztam teljes előkezelt anyaggal (Whole Slurry - WS) és mosott rosttal (Wet Washed Solid - WWS) is. A mosás célja az oldható cukrok eltávolítása volt.

A hidrolízishez a *Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme Kit - Cellulase complex NS22086* kereskedelmi enzimkészítményt használtam.

3.1.2 A mérésekhez használt oldatok és reagensek

Acetát puffer (0,05 M, pH 5)

Az oldatot az enzimes hidrolízis során használtam fel a pH biztosításához. Elkészítésekor 2,85 ml ecetsavat adtam 900 ml desztillált vízhez, majd az oldat pH-ját 10%-os NaOH oldattal (10 g NaOH 90 ml desztillált vízben feloldva) 5-re állítottam be. Az oldat térfogatát mérőlombikban 1000 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel, és ellenőriztem a beállított pH-t. A puffer eltarthatóságának növelése érdekében egy spatulahegynyi Thimerosalt adtam hozzá, mivel így a hidrolízis során viaszosodhat a reakcióelegy befertőződése.

DNS-reagens

A redukálócukor-tartalom fotometriás meghatározására alkalmas reagens mérgező vegyület, elkészítésekor és felhasználásakor gumikesztyűt viseltem. 10 g 3,5-dinitroszalicilsavat (DNS) 500 ml 2 m/m %-os NaOH-oldatban oldottam fel. Melegítés (50-60°C) és folyamatos keverés mellett 200 g kristályvizes K-Na-tartarátot, 0,5 g Na₂SO₃-ot, majd 2 g fenolt adtam hozzá. Az oldatot lehűlése után mérőlombikban desztillált vízzel 1000 ml-re egészítettem ki. A DNS-reagens narancssárga színű, fény hatására bomlik, ezért szobahőmérsékleten barna üvegben tároltam, felhasználás előtt három napig állni hagytam.

0,01 M standard glükóz oldat

A DNS-reagens kalibrációjához készítettem ismert koncentrációjú glükóz oldatot. 180 mg glükózt desztillált vízben feloldottam, majd mérőlombikban a térfogatát 100 ml-re egészítettem ki. Az így kapott oldatot felhasználásig hűtőszekrényben tároltam.

3.2 Az enzimes hidrolízis során alkalmazott módszerek

3.2.1 A kísérletek tervezése

Az előkezelt búzaszalma hidrolízise a folyamatot befolyásoló fontosabb paraméterek, a szubsztrátkoncentráció és az enzimdózis beállításonkénti változtatása mellett történt 3^2 teljes faktorterv szerint. Szubsztrátonként három centrumpontbeli beállítást készítettem (4,2 FPU¹/g enzimdózis, 5% szubsztráttartalom), később a három mérési eredmény átlagával számoltam. Mivel az itt mért értékek nem tértek el jelentősen egymástól, a többi pontban mért eredményt is elfogadhatónak tekintettem. Az többi beállítás a centrumponttól felfele vagy lefele tért el a szubsztrátkoncentráció, az enzimdózis vagy mindkettő tekintetében. Az egyes beállítások adatait a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat
A kísérleti beállítások

	Mosott rost	Teljes előkezelt anyag
WIS ² %	2,5	3
	5	5
	7,5	7
Enzimdózis FPU/g WIS	2,8	
	4,2	
	5,6	

¹ Filter Paper Unit: szűrőpapír-lebontó aktivitási egység

² Water Insoluble Solid: vízben nem oldható szárazanyag-tartalom

3.2.2 A kísérletek kivitelezése

A reakciótérfogat minden esetben 50 ml volt, az egyes reakcióelegyeket 100 ml-es csavaros üvegben folyamatosan rázattam állandó fordulatszámon (150 rpm) és hőmérsékleten (50°C), 0,05 M acetát pufferben (pH 5) 72 órán keresztül. A mintavétel 0, 4, 8, 24, 48 és 72 óra elteltével történt 2 ml-es Eppendorf-csövekbe, majd centrifugáltam őket abból a célból, hogy az oldhatatlan szubsztrátot eltávolítsam (10 min, 13000 rpm). Ezután kétféle módszerrel mértem a felülúszó cukortartalmát.

3.2.3 DNS-reagens kalibrálása, redukálócukor-tartalom mérése

Az alkalmazott DNS-reagenst a meghatározandó minták redukálócukor-tartalmának mérése előtt ismert koncentrációjú oldatokkal kalibráltam. 1 mg/ml-es glükóz törzsoldatból 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 és 1,4 ml-t kémcsövekbe mértem, majd desztillált vízzel mindegyiket 1,5 ml-re egészítettem ki. A referenciaminta (vak) 1,5 ml desztillált víz volt. Minden mintához 3,0 ml DNS-reagenst adtam, majd 5 percre forrásban lévő vízbe helyeztem őket, mely alatt lejátszódott a színreakció a nitrocsoportok aminocsoportokká redukálódása következtében. Miután lehűltek, 16-16 ml vizet adtam a mintákhoz, és homogenizáltam őket. A vak mintával szemben 550 nm-en mértem az abszorbanciát. Az így kapott értékek alapján készítettem el a DNS-reagens kalibrációs egyenesét, melynek egyenlete:

$$A_{550} = m \cdot c + b,$$

ahol A_{550} az 550 nm-en mért abszorbancia, c az egyes oldatok koncentrációja (mg/ml), m az egyenes meredeksége, b pedig a függőleges tengelymetszete.

A redukálócukor-tartalom méréséhez a mintavétel időpontjától függően hígítottam az egyes mintákat, hogy az abszorbancia majd a megfelelő tartományba essen. Ezután a DNS-reagens kalibrációjánál leírtakhoz hasonlóan mértem meg az abszorbanciákat. A kapott adatokból a következő összefüggés segítségével számoltam ki a minták redukálócukor-tartalmát:

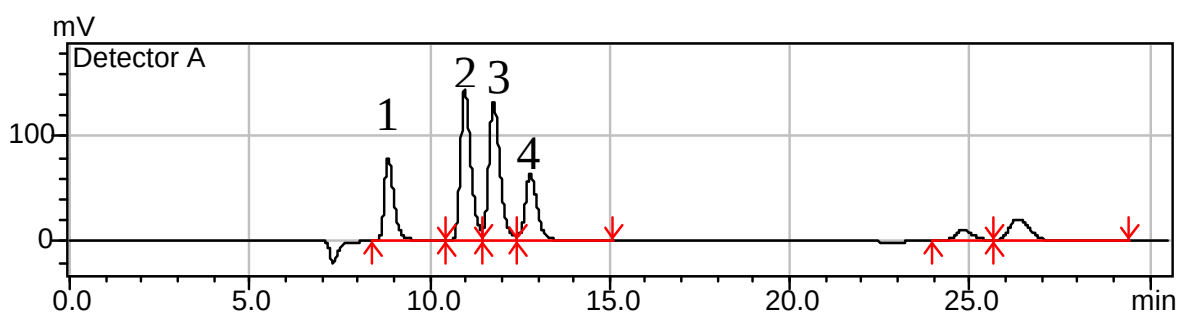
$$RC = \frac{A_{550} - b}{m} \cdot D,$$

ahol RC a redukálócukor-tartalom (mg/ml), D a minta hígítása a mérés előtt.

A módszer előnye, hogy gyors, egyszerű, így rövid idő alatt tájékozódhatunk az egyes minták redukálócukor-tartalmát illetően. Hátránya azonban, hogy nem képes különbséget tenni a redukáló cukrok között (cellobióz, glükóz, xilóz, arabinóz, stb.), illetve, hogy kevésbé pontos, mivel minden redukáló komponens ad jelet (a nem cukorkomponensek is), így előzetes, közelítő eredményeknek tekinthetők a kapott adatok. Ezt a mérést minden minta esetében elvégeztem. A modellalkotáshoz azonban a glükóz koncentrációjára volt szükségem, így ezt a módszert csak előzetes tájékozódásra használtam, és elvégeztem az összes minta HPLC-analízisét is.

3.2.4 HPLC-analízis

A modellezéshez az egyes minták glükózkoncentrációjára van szükség, ennek meghatározására a HPLC-analízis alkalmas. Megfelelő hígítás és 0,45 μm pórusméretű szűrőn való átszűrés után 1,5 ml-es HPLC-csövekbe fecskendeztem a felülúszóból vett mintákat, majd a mérésig fagyasztva tároltam őket. A HPLC-analízis során az elválasztás 65°C-on Aminex HPX-87H (300*7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kationcserélő kolonnán történt. Az analitikai kolonna előtt Cation-H (Bio-Rad) előtétkolonnát alkalmaztunk. Az eluens 5 mM H_2SO_4 volt 0,5 ml/min áramlási sebességgel, a detektálás törésmutató-mérés alapján történt (Shimadzu RID-10A, Japán). A HPLC-analízis során a felülúszó cellobióz-, glükóz-, xilóz- és arabinóztartalma is meghatározásra került (3. ábra), de ezek közül csak a glükózra vonatkozó eredményeket használtam fel a modellezéshez.



3. ábra
HPLC-standard kromatogram,
a csúcsok sorrendben: 1 - cellobióz, 2 - glükóz, 3 - xilóz, 4 - arabinóz

3.3 A modellalkotás során használt eszközök

Elsőként irodalomból vett modelleket [6] vizsgáltam abból a szempontból, hogy hogyan teljesítenek a korábbi és saját kísérleti eredményeket illetően. Mindkét, a tanulmány által megadott összefüggésben a független változó a hidrolízis ideje, a függő változó a glükózkoncentráció, a kezdeti értékek pedig az enzim dózis és a szubsztrátkoncentráció. Az egyik elsőrendű reakciónak feltételezi a celluláz inaktiválódását:

$$[P] = [S_0] \cdot \left\{ 1 - \left[1 - \frac{1 - \exp(-k_{de1}t)}{1 + (K_e/[E_0])} \right]^{k_2/k_{de1}} \right\},$$

a másik másodrendűnek:

$$[P] = [S_0] \cdot \left\{ 1 - \left[1 + \frac{K_e[E_0]}{K_e + [E_0]} k_{de2}t \right]^{-k_2/(K_e k_{de2})} \right\},$$

ahol **[P]** a glükózkoncentráció (g/l), **t** a hidrolízis ideje (h), **[S₀]** a kezdeti szubsztrátkoncentráció (g/L), **[E₀]** az enzim dózis (FPU/g WIS); a regresszióval meghatározandó konstansok pedig **K_e** egyensúlyi állandó (g/L), **k₂** termékképződési állandó (h⁻¹), továbbá az elsőrendű összefüggés esetében **k_{de1}** (h⁻¹), a másodrendűnél **k_{de2}** (L/(hg)).

A paramétereket *Matlab 7.1* programmal (*Curve Fit Tool*) határoztam meg a kísérleti eredmények egy sorozata alapján. Ahol rendelkezésre álltak megfelelő adatok, ott második illesztést is végeztem egy másik adatsorra. Az így meghatározott konstansokkal kapott összefüggéseket alkalmaztam a többi beállításra is, ehhez az ábrákat *Microsoft Excel* készítem el, és ugyanitt az illesztés jóságát is ellenőriztem az R² értékének segítségével. R² a lineáris korrelációs együttható (R) négyzete:

$$R = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}},$$

ahol **x_i** és **y_i** a két adatsor értékei (ez esetben a modell által előrejelzett adatok és a kísérleti eredmények), **$\bar{x}$** és **$\bar{y}$** pedig átlagértékek. Minél közelebb van R² 1-hez, annál jobb az illeszkedés.

Bár a modellt eredetileg búzaszalma szubsztráttal végzett kísérletek során alkották, korábbi, kukoricaszárral végzett hidrolízis eredményeivel is elvégeztem az illesztést. Ezeket a kísérleteket a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának Non-food kutatócsoportjában Drahos Eszter végezte Dr. Szengyel Zsolt témavezetésével. A kukoricaszárat gőzrobbantással kezelték elő 190°C-on 5 percig az olaszországi ENEA kutatóintézetben. A teljes előkezelt anyag reakcióelegyének vízben nem oldható szárazanyag-tartalma (WIS) az egyes kísérleti beállításoknál 2, 4, 6, 8 és 10%, az enzim dózis értéke pedig minden esetben 14 FPU/g szubsztrát volt.

A modellalkotáshoz szintén az említett, a kísérletek során kapott eredményeket használtam fel. A modell kidolgozása során célom az volt, hogy a glükózkoncentráció időbeli alakulását írjam le egy minél kevesebb illesztéssel meghatározandó paramétert tartalmazó differenciálegyenlet segítségével, tehát a termékképződés sebességét fejezzem ki. A paraméterek száma azért korlátozott, mert 5-6 kísérleti pont áll rendelkezésemre, ennyi mintavétel történt, és ennél több vagy ezzel megegyező számú paraméter esetén tökéletes illeszkedést kapnék.

A fenti modellhez hasonlóan független változónak a hidrolízis idejét, a függő változónak a glükózkoncentrációt, a kezdeti értékeknek pedig az enzim dózist és a szubsztrátkoncentrációt választottam. Figyelembe vettem az irodalomban fellelhető korábbi tapasztalatokat, mint például a glükózkoncentráció-idő görbék alakját, azt, hogy a reakciósebesség csökken az idő előrehaladtával, az enzimkoncentráció és a szubsztrátkoncentráció növelésével növekszik. Mindehhez a *Berkeley Madonna* programot használtam, ami a kísérleti eredményekre történő illesztés mellett lehetőséget ad arra is, hogy az egyes változók hatását megfigyeljem a megadott összefüggésen.

A kidolgozott modell három paramétert tartalmaz, ezek értékeinek kezdetben tetszőleges számokat adtam meg. A megoldásként kapott, a glükózkoncentráció alakulását az idő függvényében ábrázoló görbét illesztettem a kísérleti eredményekre *Berkeley Madonna* programmal. *Microsoft Excel* segítségével meghatároztam az illesztés pontosságát, majd a többi beállítás, azaz különböző szubsztrátkoncentrációk esetében is megvizsgáltam az összefüggést a kapott konstansokkal.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A búzaszalmával végzett kísérletek eredményei

A búzaszalma esetében mosott rosttal és teljes előkezelt anyaggal is dolgoztam. A mosott rostra kapott glükózkonzentrációkat (HPLC-analízis) a 3. táblázat tartalmazza, a diagramok pedig az azonos enzimdózishoz tartozó beállítások eredményeit ábrázolják (4-6. ábra).

3. táblázat

A hidrolízis során felszabadult glükóz mennyisége mosott rost esetén (g/l)

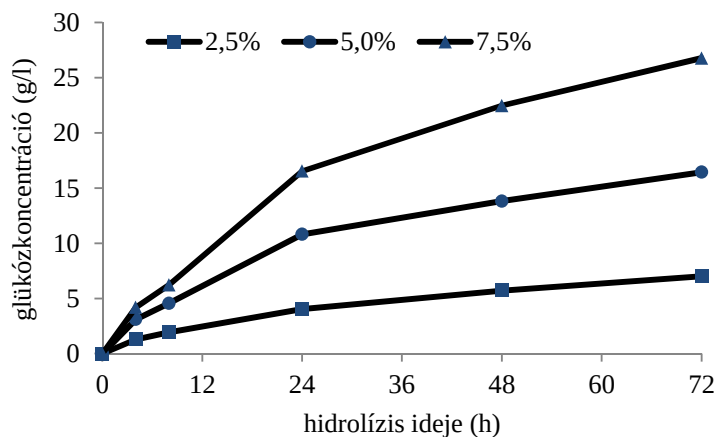
Enzimdózis FPU/g WIS	2,8			4,2			5,6		
Idő (h)	WIS (%)			WIS (%)			WIS (%)		
	2,5	5	7,5	2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	1,3	3,1	4,2	2,5	4,7	7,4	1,8	4,2	5,4
8	2,0	4,6	6,2	3,6	7,6	12,3	2,3	6,5	7,4
24	4,1	10,8	16,5	6,2	13,9	23,2	5,4	11,8	20,1
48	5,7	13,8	22,5	7,4	17,1	27,8	7,1	14,9	26,4
72	7,0	16,4	26,8	8,4	18,6	30,8	8,1	17,0	30,9

A teljes előkezelt anyagra kapott glükózkonzentrációkat a 4. táblázat tartalmazza, a diagramok pedig a mosott rosthhoz hasonlóan az azonos enzimdózishoz tartozó beállítások eredményeit ábrázolják.

4. táblázat

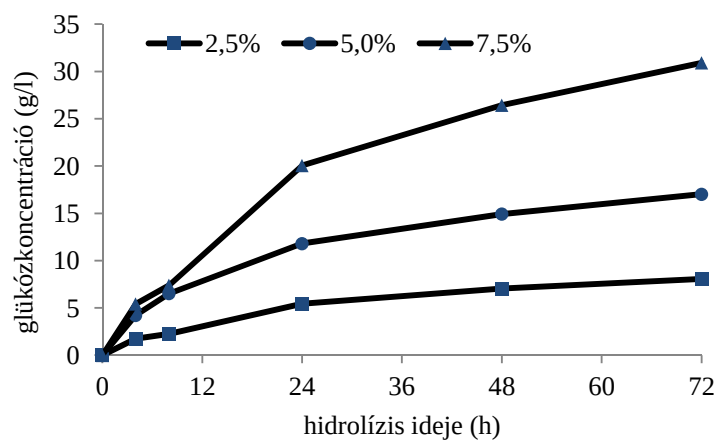
A hidrolízis során felszabadult glükóz mennyisége teljes előkezelt anyag esetén (g/l)

Enzimdózis FPU/g WIS	2,8			4,2			5,6		
Idő (h)	WIS (%)			WIS (%)			WIS (%)		
	3	5	7	3	5	7	3	5	7
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	2,6	3,7	17,9	3,3	4,5	17,0	3,7	4,5	16,5
8	3,5	5,2	18,4	4,6	6,6	19,2	5,6	7,4	20,4
24	6,5	10,9	11,0	9,2	16,7	13,4	11,2	20,3	18,5
48	8,3	19,5	18,0	10,8	22,7	n.a.	11,9	23,4	28,8
72	8,7	22,4	22,3	12,1	23,6	25,5	12,0	24,7	36,8



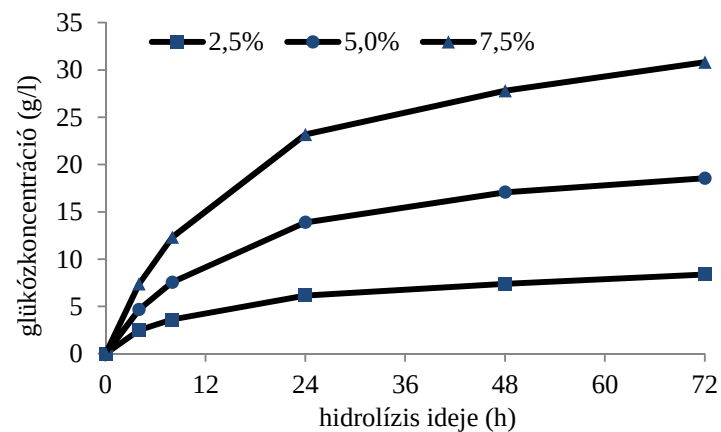
4. ábra

Mosott rost enzimes hidrolízise során felszabadult glükóz mennyisége
2,8 FPU/g enzimdózis esetén



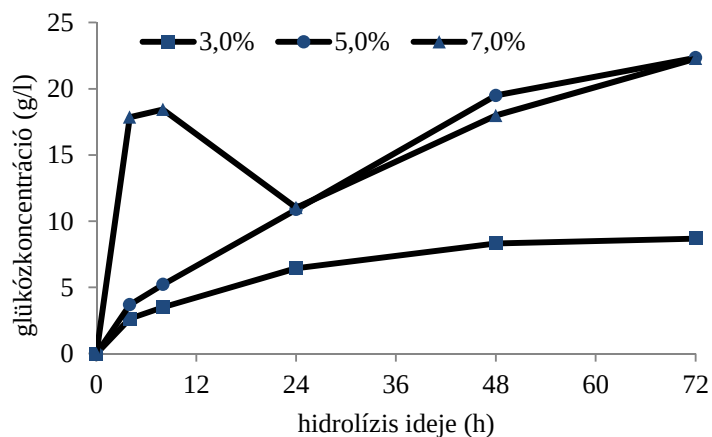
5. ábra

Mosott rost enzimes hidrolízise során felszabadult glükóz mennyisége
4,2 FPU/g enzimdózis esetén



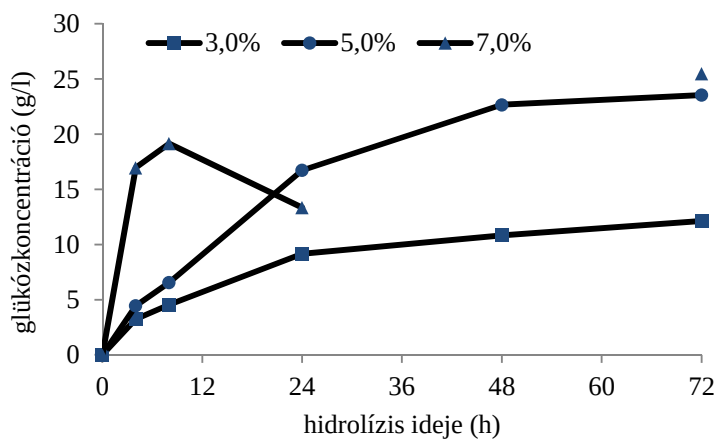
6. ábra

Mosott rost enzimes hidrolízise során felszabadult glükóz mennyisége
5,6 FPU/g enzimdózis esetén



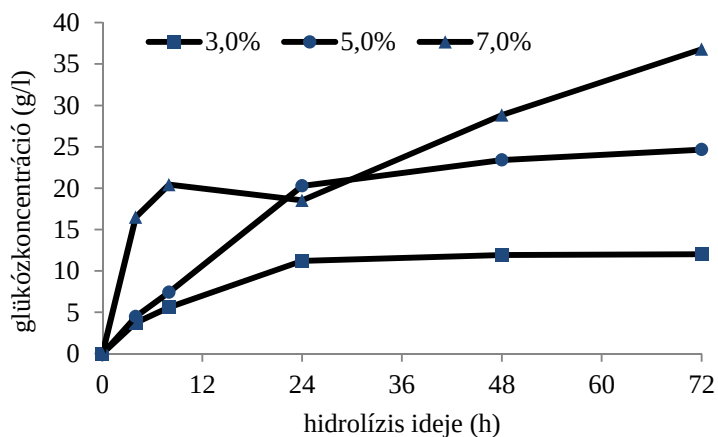
7. ábra

Teljes előkezelt anyag enzimes hidrolízise során felszabadult glükóz mennyisége
2,8 FPU/g enzimdózis esetén



8. ábra

Teljes előkezelt anyag enzimes hidrolízise során felszabadult glükóz mennyisége
4,2 FPU/g enzimdózis esetén



9. ábra

Teljes előkezelt anyag enzimes hidrolízise során felszabadult glükóz mennyisége
5,6 FPU/g enzimdózis esetén

A görbék lefutása az esetek többségében a vártnak megfelelően alakult, azaz meredekségük a hidrolízis előrehaladtával csökkent. A teljes előkezelt anyagnál azonban a legnagyobb,

7%-os vízben nem oldható szárazanyagtartalmak esetén kapott kísérleti pontokról a fenti megállapítás nem mondható el. Mivel mindhárom esetben a kiugró érték a 24 órás mintavételből származik, így ennek oka lehet szisztematikus hiba, például rossz hígítás a méréseknél. A modellek paramétereinek meghatározásánál így ezeket a pontatlan adatokat nem használtam fel az illesztéshez, és nem is alkalmaztam rájuk a kapott összefüggéseket, bemutatásuktól viszont nem tekintettem el.

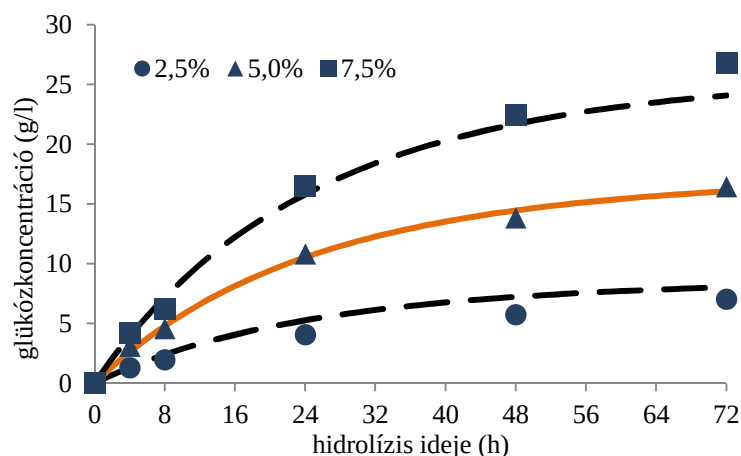
4.2 Az irodalmi modellek vizsgálatának eredményei

Az elkövetkezőkben az irodalmi modellek illeszkedését mutatom be búzaszalma (mosott rost, teljes előkezelt anyag) és kukoricaszár enzimes hidrolízisének mért adataival, majd az eredményeket értékelem. Az ábrákon a folytonos vonal jelzi azt az adatsort, amelynek értékeire az illesztést elvégeztem, a szaggatott vonalak pedig a regresszióval kapott paraméterekkel felírt összefüggések által meghatározott előrejelzések adott szubsztrátkoncentrációk esetén. Az értékelés elősegítése érdekében minden nyersanyagra táblázatosan foglaltam össze az R^2 -értékeket.

4.2.1 A búzaszalmával végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés

4.2.1.1 A mosott rosttal végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés

Az elsőrendű modell esetében az azonos enzimdózisokhoz tartozó beállítások közül az 5%-os és a 7,5%-os szubsztráttartalomhoz tartozó eredményekre is elvégeztem az illesztést. Ennek az volt az oka, hogy ugyan elsősorban a centrumbeállításokra történő regressziót kívántam vizsgálni, a középső adatsorokra való illesztés több esetben is alulbecsülte a legnagyobb szubsztrátkoncentrációhoz tartozó értékeket. Az egyes beállítások közül az 5%-os adatsorra illesztett modell paramétereivel a 2,8 FPU/g enzimdózis esetén kapott diagramot mutatom be (10. ábra).



10. ábra

Az elsőrendű reakciót feltételező összefüggés illesztése 2,8 FPU/g enzimdózis esetén,

5. táblázat

Az R^2 -értékek a mosott rost kísérleti eredményeire és az elsőrendű reakciót feltételező modell előrejelzésére vonatkozóan (5%-os sorozatra történő illesztés)

		WIS (%)		
		2,5	5	7,5
Enzimdózis (FPU/g WIS)	2,8	0,9904	0,9958	0,9945
	4,2	0,9877	0,9935	0,9803
	5,6	0,9901	0,9982	0,9978

A táblázatokból látható, hogy az 5%-os adatsorokra történő illesztés 5,6 FPU/g enzimdózisnál bizonyult a legjobbnak, míg a centrumponthoz (5% WIS, 4,2 FPU/g) kaptam a legkisebb R^2 -értékeket. 4,2 FPU/g enzimdózisnál a 7,5%-os adatsorra nem illeszkedett jól az 5%-os paraméterekkel felírt összefüggés, az ezen adatokra elvégzett illesztés azonban már jobb eredményt ad, hiszen a 4,2 FPU/g-hoz tartozó (6. táblázat) R^2 -érték 0,9960, és 2,5 illetve 5% WIS esetén is e körüli.

6. táblázat

Az R^2 -értékek a mosott rost kísérleti eredményeire és az elsőrendű reakciót feltételező modell előrejelzésére vonatkozóan (7,5%-os sorozatra történő illesztés)

		WIS (%)		
		2,5	5	7,5
Enzimdózis (FPU/g)	2,8	0,9985	0,9936	0,9967
	4,2	0,9957	0,9968	0,9960
	5,6	0,9931	0,9863	0,9944

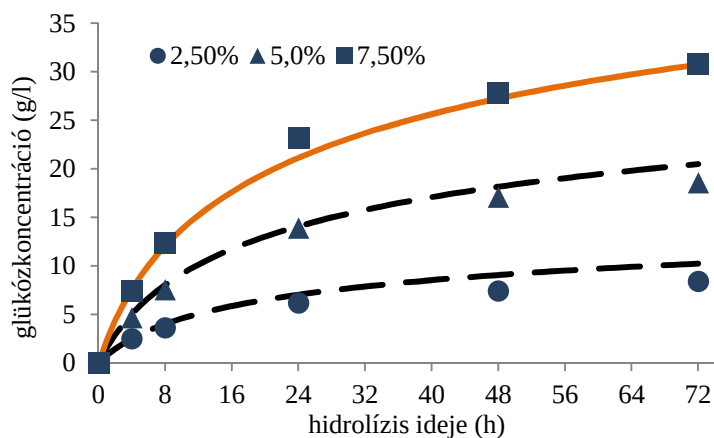
Összehasonlítottam továbbá az egyes adatsorokra való illesztésekkel kapott paraméterértékeket. Ezzel az volt a célom, hogy megvizsgáljam, mennyire egyeznek a különböző eredményekkel meghatározott konstansok, azaz van-e lehetőség egy több enzimdózis esetén is jól teljesítő paraméterhármas megadására. A modell ugyanis annál megfelelőbb, minél alkalmasabb a tényezők széles körében pontos előrejelzésre. A regresszióval meghatározott konstansokat a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat
A különböző illesztésekkel kapott paraméterek

Enzimdózis FPU/g	2,8		4,2		5,6	
Paraméterek	WIS (%)		WIS (%)		WIS (%)	
	5	7,5	5	7,5	5	7,5
K_e	4872	2384	9950	405,1	9928	9530
k_2	22,53	10,23	42,77	1,476	39,5	41,07
k_{de1}	0,035	0,027	0,049	0,029	0,055	0,053

Megállapítható, hogy a centrumpontból (5% WIS, 4,2 FPU/g) kapott paraméterek az enzimdózis változását is jól követnék, különösen 5,6 FPU/g enzimdózis esetében.

A másodrendű reakciót feltételező összefüggés esetén az illesztéssel és az értékeléssel szintén a fent leírtaknak megfelelően jártam el. A diagramok közül a 7,5%-os adatsorra illesztett modell paramétereivel az 5,6 FPU/g enzimdózis esetén kapott diagramot mutatom be (11. ábra).



11. ábra

A másodrendű reakciót feltételező összefüggés illesztése 5,6 FPU/g enzimdózis esetén

8. táblázat

Az R^2 -értékek a mosott rost kísérleti eredményeire és a másodrendű reakciót feltételező modell előrejelzésére vonatkozóan (5%-os sorozatra történő illesztés)

		WIS (%)		
		2,5	5	7,5
Enzimdózis (FPU/g WIS)	2,8	0,9968	0,9963	0,9946
	4,2	0,9895	0,9996	0,9810
	5,6	0,9964	0,9969	0,9960

9. táblázat

Az R^2 -értékek a mosott rost kísérleti eredményeire és a másodrendű reakciót feltételező modell előrejelzésére vonatkozóan (7,5%-os sorozatra történő illesztés)

		WIS (%)		
		2,5	5	7,5
Enzimdózis (FPU/g WIS)	2,8	0,9985	0,9936	0,9967
	4,2	0,9957	0,9968	0,9960
	5,6	0,9931	0,9863	0,9944

A 8. és 9. táblázatokból, melyek az R^2 -értékeket foglalják össze, jól látható, hogy 2,8 FPU/g enzimdózisnál mindkét adatsor jól illeszkedik, míg 5,6 FPU/g esetében az 5%-os adatokra illesztett modell teljesít jobban, ami 4,2 FPU/g-nál itt is jelentősen alulbecsüli a kísérleti eredményeket. Így a centrumpontra való illesztés itt sem bizonyul a legmegfelelőbbnek.

A másodrendű reakciót feltételező modell az irodalomban leírtaknak megfelelően alkalmasabbnak bizonyult az enzimes hidrolízis során felszabaduló glükóz mennyiségének előrejelzésére az R^2 -értékek alapján.

A paraméterértékeket a 10. táblázat foglalja össze.

10. táblázat

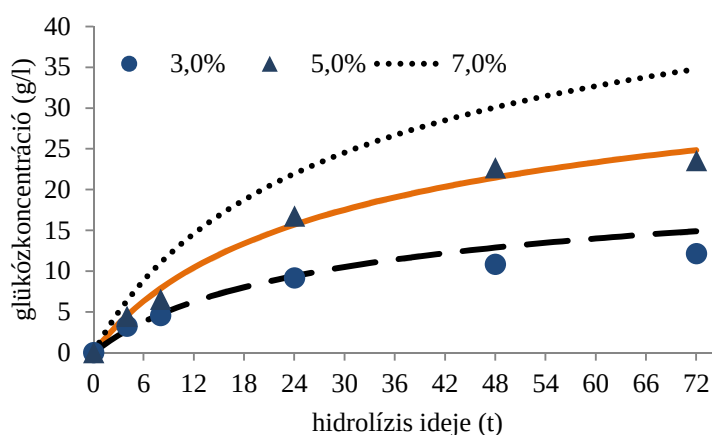
A különböző illesztésekkel kapott paraméterek

Enzimdózis (FPU/g WIS)	2,8		4,2		5,6	
Paraméterek	WIS (%)		WIS (%)		WIS (%)	
	5	7,5	5	7,5	5	7,5
K_e	-0,143	-0,287	-0,251	-0,102	0,509	0,487
k_2	0,016	0,012	0,0251	0,017	0,036	0,037
k_{de2}	-0,645	-0,183	-0,747	-0,624	0,473	0,442

4.2.1.2 A teljes előkezelt anyaggal végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés

A legnagyobb szubsztrátkoncentráció (7%) melletti adatsorokat a már említett okok miatt nem dolgoztam fel az illesztéseknél, így ezek nem is szerepelnek az ábrákon.

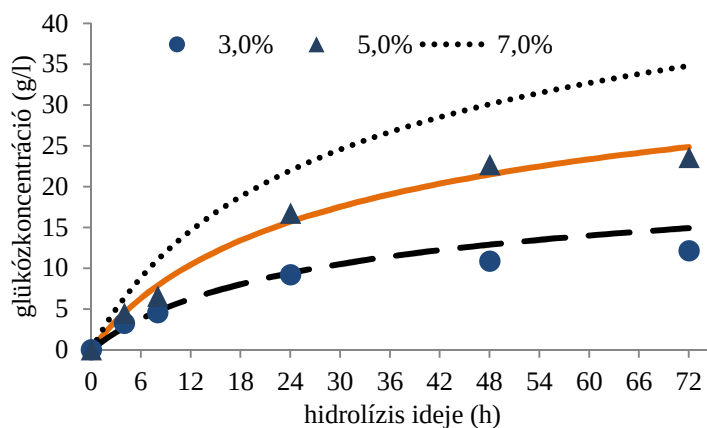
Az elsőrendű reakciót feltételező modellnél a centrumbeállítás eredményeihez (4,2 FPU/g, 5% WIS) tartozó adatsorra illesztve határoztam meg a paramétereket. Pontozott vonallal jelöltem a 7%-os WIS-értékhez tartozó, modell általi előrejelzést (12. ábra).



12. ábra

Az elsőrendű reakciót feltételező összefüggés illesztése a centrumbeállítás eredményeire

A másodrendű reakciót feltételező összefüggés esetében a fentihez hasonlóan jártam el (13. ábra).



13. ábra

A másodrendű reakciót feltételező összefüggés illesztése a centrumbeállítás eredményeire

11. táblázat

Az R^2 -értékek a teljes előkezelt anyag kísérleti eredményeire és az elsőrendű reakciót feltételező modell előrejelzésére vonatkozóan (5%-os sorozatra történő illesztés)

		WIS (%)	
		3	5
Enzimdózis (FPU/g WIS)	2,8	0,9436	0,9923
	4,2	0,9828	0,9984
	5,6	0,9754	0,9976

12. táblázat

Az R^2 -értékek a teljes előkezelt anyag kísérleti eredményeire és a másodrendű reakciót feltételező modell előrejelzésére vonatkozóan (5%-os sorozatra történő illesztés)

		WIS (%)	
		3	5
Enzimdózis (FPU/g WIS)	2,8	0,9434	0,9920
	4,2	0,9842	0,9883
	5,6	0,9399	0,9726

A 11. és 12. táblázatokból a mosott rostra kapott eredményekkel ellentétes következtetést vonhatunk le. A másodrendű reakciót feltételező modell ugyanis kevésbé teljesít jól búzaszalma szubsztrát esetén, mint az elsőrendűt feltételező összefüggés. A különböző viselkedés oka a szubsztrátok eltérő kezelése lehet, és arra utal, hogy a modell az ebből eredő különbségeket nem tudja megfelelően kezelni.

4.2.2 A kukoricaszárral végzett kísérletek eredményein alapuló illesztés

A kukoricaszár enzimes hidrolízisének rendelkezésemre bocsátott adatait (13. táblázat, Non-food kutatócsoport) használtam fel az előző fejezetben bemutatott modellek vizsgálatához.

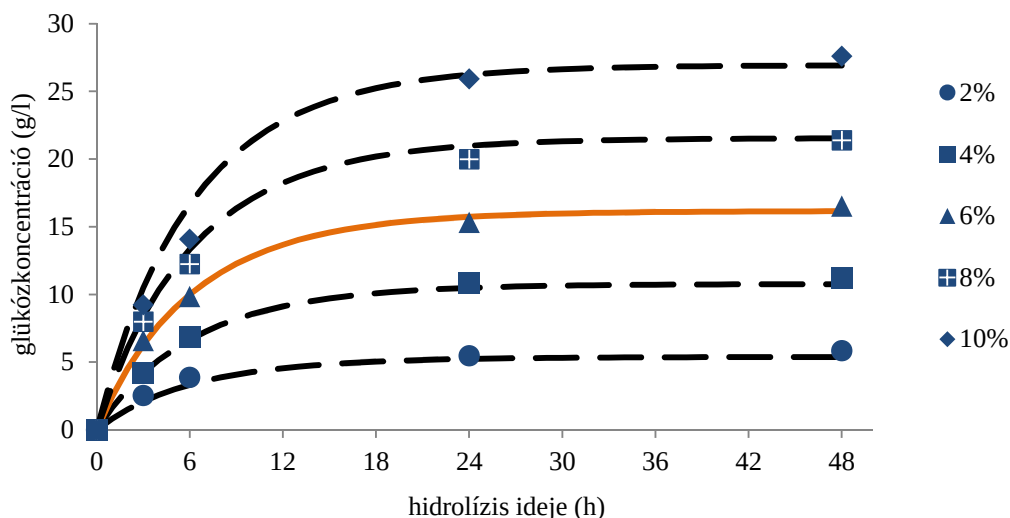
13. táblázat

A hidrolízis alatt keletkezett glükóz mennyisége (g/l), enzimdózis: 30 FPU/g

Idő (h)	WIS (%)				
	2	4	6	8	10
0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0
3	2,5	4,20	6,6	7,9	9,2
6	3,9	6,9	9,8	12,2	14,1
24	5,5	10,8	15,3	19,9	25,9
48	5,9	11,2	16,5	21,4	27,6

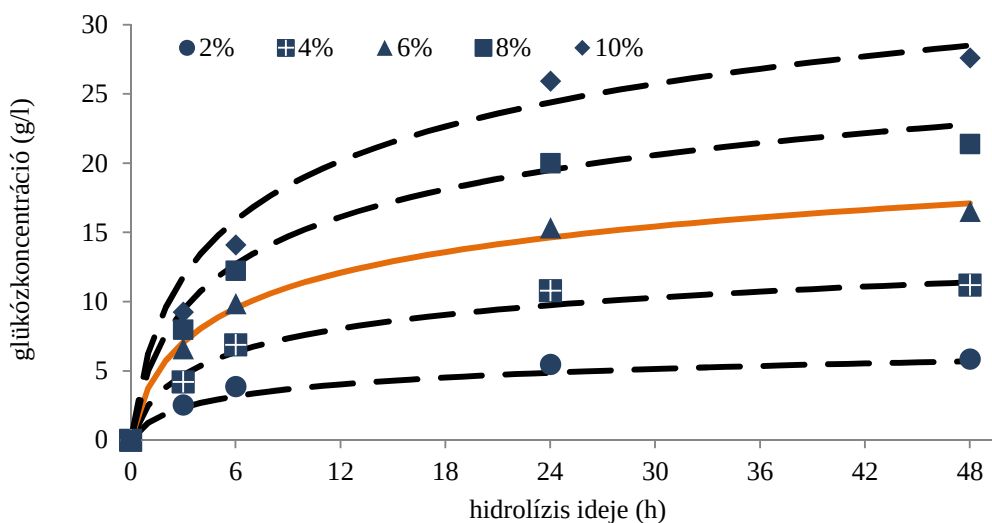
A fenti eredményekkel is elvégeztem az illesztéseket, itt minden esetben a 6%-os WIS adataival határoztam meg a paramétereket.

A 14. ábra a mintavételi időpontokban mért glükózkoncentrációk mellett az elsőrendű reakciót feltételező modell előrejelzéseit mutatja. Már a görbék lefutásából feltételezhető a megfelelő illeszkedés.



14. ábra
Az elsőrendű reakciót feltételező összefüggés illesztése,
paraméterek: $K_e = 16490$; $k_2 = 25,08$; $k_{de1} = 1,452$

A 15. ábra a másodrendű reakciót feltételező modellre vonatkozik. A diagram alapján megállapítható, hogy ez az összefüggés is jól közelíti a kísérleti eredményeket, azonban itt már nagyobb az eltérés, mint az előző esetben. A publikáció [6], ahonnan a modell származik, ez utóbbit találta pontosabbnak. Az ez esetben tapasztalt eltérés oka lehet az, hogy a cikkben búzaszalma szubsztrátot vizsgáltak, míg ezek az adatok kukoricaszárra vonatkoznak.



15. ábra
A másodrendű reakciót feltételező összefüggés illesztése,
paraméterek: $K_e = 2,683$; $k_2 = 0,483$; $k_{de2} = 5,852$

A fentiek alapján megállapítható, hogy ez az irodalomban közölt modell korlátokkal ugyan, de jó előrejelzést ad. A korlátok közé tartozik, hogy különböző szubsztrátok esetében eltérő pontossággal működik.

A számított R^2 -értékek (14. táblázat) is a fenti megállapításokat igazolják, azaz azt, hogy kukoricaszár esetében az elsőrendű összefüggés jobban teljesít a másodrendűnél. Ezt még jobban nyomatékosítja az, hogy az első esetben minden R^2 -érték nagyobb az ugyanazon szubsztrátkoncentrációhoz tartozónál.

14. táblázat
Az R^2 -értékek a kukoricaszárral végzett kísérleti eredményekre
és a modell előrejelzésére vonatkozóan

	WIS (%)				
	2	4	6	8	10
Elsőrendű reakciót feltételező összefüggés	0,9924	0,9889	0,9931	0,9889	0,9754
Másodrendű reakciót feltételező összefüggés	0,9798	0,9706	0,9844	0,9789	0,9666

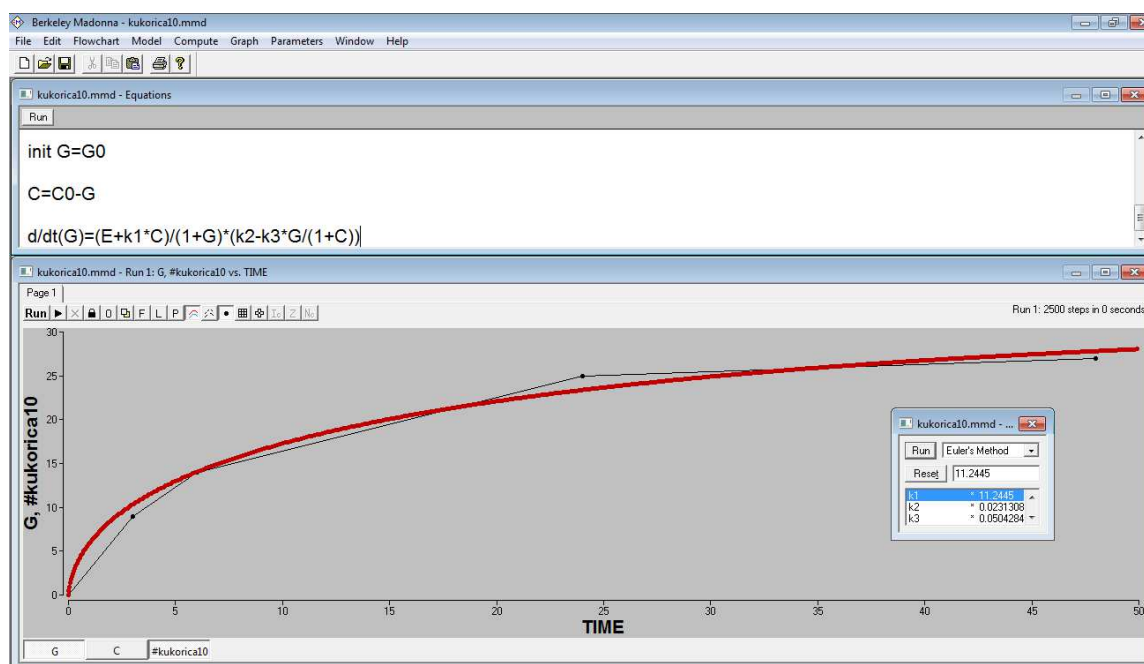
4.3 A saját modell és vizsgálatának eredményei

Az előző fejezetben ismertetett módszerekkel megalkotott összefüggés a következő:

$$\frac{dG}{dt} = \frac{[E] + k_1[C]}{[G] + 1} \left(k_2 - \frac{k_3[G]}{[C] + 1} \right),$$

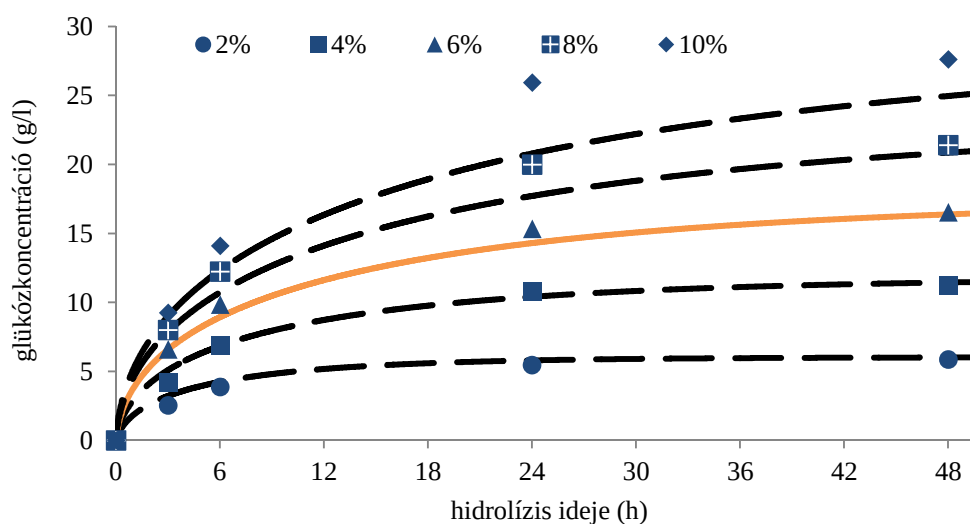
ahol **[G]** a glükózkoncentráció (g/l), **t** a hidrolízis ideje (h), **[C]** a szubsztrátkoncentráció (g/L), **[E]** az enzim dózis (FPU/g); a regresszióval meghatározandó konstansok pedig **k₁**, **k₂** és **k₃**, melyek az illesztés paraméterei, nem rendelkeznek fizikai jelentéssel.

A felírt összefüggés illesztése a kísérleti eredmények egy sorozatára szintén *Berkeley Madonna* program segítségével történt (16. ábra).

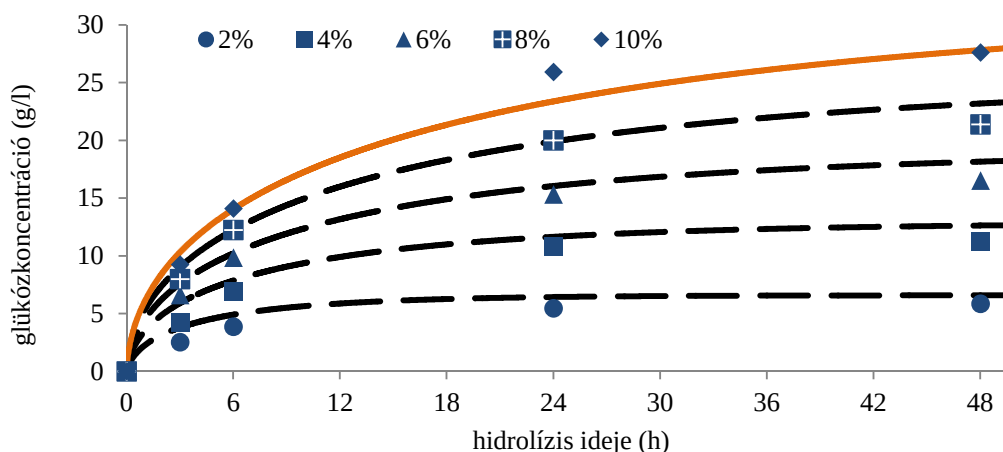


16. ábra
Berkeley Madonna – görbeillesztés

Kukoricaszár esetében a modell megfelelően illeszkedik a kísérleti eredményekre. Először a 6%-os szubsztráttartalom sorozatára végeztem el a regressziót (17. ábra), majd mivel a legnagyobb szubsztrátkoncentrációhoz tartozó értékeket alulbecsülte, megvizsgáltam, hogy a 10%-os sorozatra jobb illeszkedést kapok-e (18. ábra).



17. ábra
A modell illesztése a kukoricaszárnál kapott eredményekre,
paraméterek: $k_1 = 25,289$, $k_2 = 0,008$, $k_3 = 0,019$



18. ábra

A modell illesztése a kukoricaszárnál kapott eredményekre,
paraméterek: $k_1 = 11,245$, $k_2 = 0,023$, $k_3 = 0,050$

Az R^2 -értékekből kiderült, hogy a 6%-os sorozatra történő illesztés összességében pontosabb (15. táblázat), nagyobb szárazanyag-tartalomnál viszont a 10%-ossal kapott paraméterek adnak jobb eredményt.

15. táblázat

Az R^2 -értékek a kukoricaszárral végzett kísérleti eredményekre
és a modell előrejelzésére vonatkozóan

	WIS (%)				
	2	4	6	8	10
Illesztés a 6%-os sorozatra	0,9890	0,9902	0,9955	0,9915	0,9881
Illesztés a 10%-os sorozatra	0,9774	0,9878	0,9966	0,9928	0,9884

A modell tehát kukoricaszár esetében jobban teljesít, mint búzaszalmánál, ami következhet az eltérő szubsztrátulajdonságokból. Ugyanakkor az is megállapítható, hogy az általam kidolgozott modellben kukoricaszár szubsztrátnál az R^2 -értékek nagyobbak, mint az irodalmi modell ugyanazon sorozatára történő illesztésnél. A centrumbeállítás (6% WIS) esetében az irodalmi modelleknél ezek az értékek 0,9931 illetve 0,9844, a saját összefüggés 0,9955-ös R^2 -értéket ad, továbbá a 2%-os WIS kivételével mindenhol jobb eredményt szolgáltat.

Ezek alapján megállapítható, hogy az általam kidolgozott módszer alkalmasabb kukoricaszárból, mint lignocellulóz biomasszából kiinduló második generációs bioetanol-előállítás során a glükózkoncentráció alakulásának előzetes meghatározására az enzimes hidrolízis ideje alatt, és ezáltal megfelel annak a célnak, hogy hozzájáruljon az eljárás hatékonyabbá tételéhez. A módszer továbbfejleszthető: amennyiben fizikai jelentéssel rendelkező, szubsztrátra jellemző paramétert építünk be az összefüggésbe, lehetőségem nyílik a modell finomítására, kiterjesztésére.

5. Összefoglalás

Munkám során célom a második generációs bioetanol-előállítás hatékonyságának növelése volt az enzimes hidrolízis kinetikájának modellezését felhasználva eszközül. Áttekintettem a vonatkozó irodalmat, és megállapítottam, hogy az alkalmazott modellek nem megfelelő pontossággal írják le a folyamatot, vagy csak bizonyos korlátok mellett képesek erre. Célom egy, az irodalomban fellelhető modelleknél jobb egyezést mutató összefüggés kidolgozása és validálása volt.

A modellalkotáshoz a kiindulási adatokat a Non-food kutatócsoportban kukoricaszárral végzett korábbi, valamint extrudált búzaszalma enzimes hidrolízisének saját kísérleti eredményei szolgáltatták. A mérésekhez kísérleti tervet készítettem, ez a különböző beállítások enzimdózisát és vízben nem oldható szárazanyag-tartalmát foglalta magában. Az eredmények felhasználásával megalkottam egy empirikus modellt, mely a glükóz képződésének sebességét leíró differenciálegyenlet. Ezt követően a létrehozott összefüggés előrejelzésének pontosságát összehasonlítottam irodalmi modellek ugyanezen kísérleti eredményekre kapott illeszkedésével. Kimutattam, hogy az általam kidolgozott modellben kukoricaszár szubsztrátnál az R^2 -értékek ugyanazon sorozatra történő illesztésnél nagyobbak, mint az irodalmiak. A centrumbeállítás (6% vízben nem oldható szárazanyag-tartalom) esetében az irodalmi modelleknél az R^2 -értéke 0,9931 illetve 0,9844, a saját összefüggés 0,9955-ös R^2 -értéket ad, továbbá egy kísérleti beállítás kivételével mindenhol jobb eredményt szolgáltat.

Ezek alapján megállapítható, hogy az általam kidolgozott módszer a vizsgált irodalmi modelleknél alkalmasabb kukoricaszárból, mint lignocellulóz biomasszából kiinduló második generációs bioetanol-előállítás során a glükózkoncentráció alakulásának előzetes meghatározására az enzimes hidrolízis ideje alatt, és ezáltal megfelel annak a célnak, hogy hozzájáruljon az eljárás hatékonyabbá tételéhez. A módszer továbbfejleszthető: amennyiben fizikai jelentéssel rendelkező, szubsztrátra jellemző paramétert építünk be az összefüggésbe, így lehetőségem nyílik a modell finomítására, kiterjesztésére.

6. Irodalomjegyzék

A dolgozat hivatkozásainak előfordulási sorrendjében

-
- [1] Limayem A., Ricke S.C., Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects, *Progress in Energy and Combustion Science* 38 (2012) 449-467
- [2] Van Dyk J.S., Pletschke B.I., A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnology Advances* (2012)
DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.002
- [3] Menon V., Rao M., Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science* 38 (2012) 522-550
- [4] Kuma, S., Surendra P.S., Mishra I.M., Adhikari D.K., Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass, *Chemical Engineering & Technology* 32 (2009) 4517-526
- [5] Viikari L., Vehmaanpera J., Koivula A., Lignocellulosic ethanol: From science to industry, *Biomass and Bioenergy* (2012) DOI:10.1016/j.biombioe.2012.05.008
- [6] Bansal P., Hall M., Realff M.J., Lee J.H., Bommarius A. S., Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates, *Biotechnology Advances* 27 (2009) 833-848
- [7] Gama F.M., Mota M., Enzymatic hydrolysis of cellulose(I): Relationship between kinetics and physico-chemical parameters, *Biocatalysis and Biotransformation* 15 (1997) 221-236
- [8] Velkovska S., Marten M.R., Ollis D.F., Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30, *Journal of Biotechnology* 54 (1997) 83-94
- [9] Zhang Y., Xu J.L., Xu H.J., Yuan Z.H., Guo Y., Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw, *Bioresource Technology* 101 (2010) 8261-8266
- [10] Shen, J., Agblevor, F.A., Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate, *Biochemical Engineering Journal* 41 (2008) 241-250.
- [11] Héctor A.R., Vicente .A., Teixeira J.A., Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process, *Industrial Crops and Products* 36 (2012) 100-107

-
- [12] Ye Z., Berson R.E., Kinetic modeling of cellulose hydrolysis with first order inactivation of adsorbed cellulase, *Bioresource Technology* 102 (2011) 11194-11199
- [13] Zheng Y., Pan Z., Zhang R., Jenkins B.M., Kinetic Modeling for Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Creeping Wild Ryegrass, *Biotechnology and Bioengineering* 102 (2009) 1559-1569
- [14] Kadam K.L., Rydholm E.C., McMillan J.D., Development and Validation of a Kinetic Model for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, *Biotechnology Progress* 20 (2004) 698-705
- [15] Hodge D.B., Karim M.N., Schell D.J., McMillan J.D., Model-Based Fed-Batch for High-Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152 (2009) 88-107
- [16] Hosseini S.A., Shah N., Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase, *Biomass and Bioenergy* 35 (2011) 3841-3848
- [17] Hosseini S.A., Shah N., Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model, *Biomass and Bioenergy* 35 (2011) 3830-3840
- [18] Våljamäe P., Sild V., Petterson G., Johansson G., The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II, is consistent with a cellulose surface - erosion model, *European Journal of Biochemistry* 253 (1998) 469-475
- [19] Carrillo F., Lis M.J., Colom X., López-Mesas M., Valldeperas J., Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study, *Process Biochemistry* 40 (2005) 3360–3364
- [20] Gan Q., Allen S.J., Taylor G., Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling *Process Biochemistry* 38 (2003) 1003-1018
- [21] Percival Zhang Y.H., Lynd L.R., Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 88 (2004) 797-824
- [22] Y.-H. Percival Zhang, Lee R. Lynd, A Functionally Based Model for Hydrolysis of Cellulose by Fungal Cellulase, *Biotechnology and Bioengineering* 94 (2006) 888-898
- [23] Cekmecelioglu D., Uncu O.N. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of pretreated kitchen wastes for enhancing bioethanol production. *Waste Management* (2012) <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.003>

-
- [24] Tarantili P.A., Koullas D.P., Christakopoulos P., Kekos D., Koukios E.G., Macris B.J., Cross-synergism in enzymatic hydrolysis of lignocellulosics: Mathematical correlations according to a hyperbolic model, *Biomass and Bioenergy*, 10 (1996) 213-219
- [25] Ljunggren M., Kinetic Analysis and modeling of enzymatic hydrolysis and SSF; <http://www.chemeng.lth.se/exjobb/061.pdf>; Letöltés dátuma: 2012. 09. 06.
- [26] Li C., Yoshimoto M., Tsukuda N., Fukunaga K., Nakao K., A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation, *Biochemical Engineering Journal* 19 (2004) 155–164
- [27] Teoh Y.P., Don M.M., Kinetic model for the hydrolysis of sterilized palm press fibre, *Chemical Engineering Science* 66 (2011) 3523–3530
- [28] Radeva G., Valchev I., Petrin S., Valcheva E., Tsekova P., Kinetic model of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw, *Carbohydrate Polymers* 87 (2012) 1280-1285

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet témavezetőmnek, Dr. Barta Zsolt egyetemi tanársegédnek, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy hallgatóként bekapcsolódjak a kutatómunkába, kérdéseimre mindig készségesen válaszolt, és hasznos tanácsaival segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Fehér Csaba doktoránsnak a laboratóriumi munka során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Kardosné Fülöp Tündének, hogy a munka kezdetén minden segítséget és támogatást megadott, és türelemmel válaszolt kérdéseimre.

Köszönettel tartozom a kutatócsoport minden tagjának a munkám során nyújtott segítségért.